

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

事業名: 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業(創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業)
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名: (日本語) 改良型 ChIP-seq 解析によるタンパクプロファイリング技術の高度化
(英語) Improvement of genome wide protein binding profile analyses through
modified ChIP-seq technology

研究開発担当者 (日本語) 東京大学分子細胞生物学研究所 教授 白髭克彦
所属 役職 氏名: (英語) Katsuhiko Shirahige, Professor, Institute of Molecular and Cellular
Biosciences, The University of Tokyo

実施期間: 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要(総括研究報告)

分担機関である木村宏教授(東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系)と共同で、「微量化」に必須である染色体免疫沈降効率の高い抗体の作成、また染色体可溶化の試行錯誤を試みた。マウスモノクローナル抗体の作成を基本的なヒストン修飾(5種類)、さらに H2AX、H3K9Ac、H3K9me2、H3K27me2、RNA ポリメラーゼ(ポリメラーゼの修飾を検出)等について試み、その結果、ほぼ全てについて 10%以上の免沈効率が得られ、「微量化」に使用できる感度の良い抗体を得ることが出来た。さらに、「微量化」による高度化に対応するため、染色体の断片化及び可溶化、免疫沈降反応、DNA 精製過程、またライブラリー調整法の改良を行った。特に、試料が微量のため、サンプルの損失を防ぐ閉鎖系による DNA 断片化、ステップの簡素化、同一チューブ内でのライブラリー調製を取り入れ、上記の抗体を使用した場合、1000 細胞からの ChIP-seq 法に対応可能となった。さらに、木村と共同で 1 細胞 ChIP-seq 技術として、クロマチン挿入標識技術(ChILT ; chromatin integration labeling technology)を開発した。

研究支援事業では、上記の抗体、また染色体免疫沈降法を含むプロトコルを希望する研究に配布、実際にディスカッションをしながら直接、指導を行うと共に、幾つかのサンプルは直接受け取り、微量 ChIPseq 解析の全行程を受託した。期間中、12 研究室 214 サンプルのサンプル調整、データ解析を行った。データ解析には、当研究室で開発された ChIP-seq 解析可視化ツールである DROMPA を改良したものを使用した。その中で必要に応じて、ノイズシグナルを除去するために異なる生物種由来のゲノム DNA を reference としてサンプルに等量入れ、ChIP-seq を行い、シーケンス後に得られた reference リード数を正規化に用いることで、バックグラウンドの量を補正し、ノイズシグナルを除去する手法である spike-in ChIP-seq 法を構築し、用いた。この解析手法を使うことで技術的要因によるばらつきに対してより定量的解析を行うことができるようになった。受託したサンプルでは、得られた DNA 量（細胞数）があらかじめ伝達された情報とは異なり、ばらつきがあった。これは、微量の細胞では回収段階から視覚的に捉えるのが難しいため、このばらつきは防ぐ事が不可能であると思われる。そのため、定量性や各サンプル間での比較の解析を行う場合、spike-in ChIPseq を取り入れた解析が必要となるだろう。

In collaboration with Professor Hiroshi Kimura (Tokyo Institute of Technology, Bioscience and Biotechnology Science Institute of Bioscience and Biotechnology), we have been working on the preparation of antibodies with high chromosome immunoprecipitation efficiency essential for "small scale ChIP-seq". We also try to optimize the condition to solubilize chromosome. Mouse monoclonal antibody was prepared for almost all types of basic epigenetic marks including H3K4me3, H3K4me1, H3K27ac, H3K27me3, H2AX, H3K9Ac, H3K9me2, H3K9me3, RNA polymerases, and so on. All antibodies show immunoprecipitation efficiencies higher than of 10% or more, thus the basic epigenetic antibodies set for "small scale ChIP-seq" was obtained. Furthermore, by optimizing conditions for chromosome fragmentation, solubilization, immunoprecipitation, DNA purification process and library preparation process we finally establish the protocol for successful ChIP-seq from 1,000 cells. We also establish single cell ChIP-seq protocol by labeling antibody with oligonucleotide that can target transposase (ChILT-seq ; chromatin integration labeling technology) to the sites nearby protein binding sites.

For the research supporting project, we distribute the above antibodies and protocols on request. Direct instruction by inviting researchers to our laboratory was also done. For some samples we carried out whole process of ChIP-seq. In total, 214 sample preparations and data analyses from 12 laboratories were conducted. For data analysis, we modified DROMPA (DRaw and Observe Multiple enrichment Profiles and Annotation) developed by our laboratory. Especially, we established and applied quantitative ChIP-seq protocols for the fair comparison of various ChIP-seq profiles. In this protocol, equal amounts of genomic DNA from different species is added as a reference to eliminate noise

signals (so called spike in ChIP-seq), i.e. by using the read numbers of different species for normalization. By using this method it became possible to perform more quantitative analysis even on samples with variations due to technical factors.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 8 件)

1. Two components of aversive memory in *Drosophila*, anesthesia-sensitive and anesthesia-resistant memory, require distinct domains within the Rgk1 small GTPase. Murakami S, Minami-Ohtsubo M, Nakato R, Shirahige K, Tabata T. **J Neurosci.** 2017 Apr 17. pii: 3648-16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3648-16.2017
2. Decreased cohesin in the brain leads to defective synapse development and anxiety-related behavior. Fujita Y, Masuda K, Bando M, Nakato R, Katou Y, Tanaka T, Nakayama M, Takao K, Miyakawa T, Tanaka T, Ago Y, Hashimoto H, Shirahige K, Yamashita T. **J Exp Med.** 2017 May 1;214(5):1431-1452. doi: 10.1084/jem.20161517. Epub 2017 Apr 13.
3. Identification of a variant-specific phosphorylation of TH2A during spermiogenesis. Hada M, Masuda K, Yamaguchi K, Shirahige K, Okada Y. **Sci Rep.** 2017 Apr 7;7:46228. doi: 10.1038/srep46228.
4. ChIP-seq Analysis of Condensin Complex in Cultured Mammalian Cells. Sakata T, Shirahige K, Sutani T. **Methods Mol Biol.** 2017;1515:257-271.
5. ASBEL-TCF3 complex is required for the tumorigenicity of colorectal cancer cells. Taniue K, Kurimoto A, Takeda Y, Nagashima T, Okada-Hatakeyama M, Katou Y, Shirahige K, Akiyama T. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2016 Oct 21. pii: 201605938
6. Chromatin determinants of the inner-centromere rely on replication factors with functions that impart cohesion. Abe T, Kawasumi R, Arakawa H, Hori T, Shirahige K, Losada A, Fukagawa T, Branzei D. **Oncotarget.** 2016 Oct 18;7(42):67934-67947. doi: 10.18632/oncotarget.11982.
7. MYU, a Target lncRNA for Wnt/c-Myc Signaling, Mediates Induction of CDK6 to Promote Cell Cycle Progression. Kawasaki Y, Komiya M, Matsumura K, Negishi L, Suda S, Okuno M, Yokota N, Osada T, Nagashima T, Hiyoshi M, Okada-Hatakeyama M, Kitayama J, Shirahige K, Akiyama T. **Cell Rep.** 2016 Sep 6;16(10):2554-64. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.015. Epub 2016 Aug 25.
8. DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. Koya J, Kataoka K, Sato T, Bando M, Kato Y, Tsuruta-Kishino T, Kobayashi H, Narukawa K, Miyoshi H, Shirahige K, Kurokawa M. **Nat Commun.** 2016 Mar 24;7:10924. doi: 10.1038/ncomms10924.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Genetic Link of Human Rare Diseases Identify Regulatory Mechanism of Transcription by Cohesin and its Loader, 口頭, 白髭克彦, CIFAR Genetic Network Workshop, 2016/04/15-2016/04/17, 国外
2. Transcriptional regulation by cohesin and its loader, 口頭, 白髭克彦, CdLS, 2016/06/21-2016/06/27, 国外
3. DNA 複製の過去・現在・未来 - ゲノム複製からエピゲノム複製へ, 口頭, 白髭克彦, 岡崎フラグメント 50 周年シンポジウム, 2015/10/19, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 岡山県立岡山朝日高等学校による研究所訪問、白髭克彦、東京大学分子細胞生物学研究所、2015年7月12日、国内

(4) 特許出願

特になし